

文章编号 (Article ID): 1009- 2137(2011)03- 0717- 04

• 论著 •

双重 PCR 检测急性髓系白血病 *FLT3-ITD* 和 *NPM1* 基因突变

张泽川*, 鹿全意, 赵江宁, 陈亚玫, 李志鹏¹福建医科大学教学医院(厦门中山医院), 福建厦门 361004¹ 厦门大学生命科学院, 福建厦门 361000

摘要 本研究旨在建立一种同时筛查 *FLT3-ITD* 突变和 *NPM1* 突变的检测方法。设计 2 对引物, 分别扩增 *NPM1* 基因的外显子 12 和 *FLT3* 基因的外显子 14 内含子 14 外显子 15 以覆盖几乎所有已知突变位点。对双重 PCR 体系的反应程序和引物浓度比例进行优化, 将双重 PCR 产物通过毛细管电泳分离, 根据野生型产物和突变型产物的大小差异来判断突变存在与否并利用产物的峰面积对突变比例进行定量, 并对突变阳性标本进行测序验证。结果表明, 在 93 例标本中 *NPM1* 突变者 17 例 (18.5%), *FLT3-ITD* 突变者 15 例 (16.3%), *NPM1* 突变和 *FLT3-ITD* 突变双阳性 6 例。17 例 *NPM1* 突变中 7 例 *M₂*, 4 例 *M₄*, 5 例 *M₅*, 1 例 *M₆*, 其中 10 例男性、7 例女性; 有 15 例为 A 型, 1 例为 B 型, 1 例为 Nm 型; 有 1 例 CML 急变为 AML 的标本中带有 *NPM1* 基因 A 型突变。15 例 *FLT3-ITD* 阳性中 1 例 *M₁*, 8 例 *M₂*, 2 例 *M₃*, 1 例 *M₄*, 3 例 *M₅*, 其中 5 例男性、10 例女性。扩增产物测序结果进一步证明了该检测体系的准确性和可靠性。结论: 建立了同时筛查 *FLT3-ITD* 突变和 *NPM1* 突变的检测体系, 该体系以基因组 DNA 为模板, 具有方便、快捷、准确、可定量的优点。

关键词 白血病; *NPM1* 基因; *FLT3* 基因; 内部串联重复; 毛细管电泳

中图分类号 R733.71; R446.1

文献标识码 A

Simultaneous Detection of *FLT3-ITD* and *NPM1* Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia by Double PCR

ZHANG Ze-Chuan, LU Quan-Yi, ZHAO Jiang-Ning, CHEN Ya-Mei, LI Zhi-Peng¹Fujian Medical University Clinical Teaching Hospital (Xiamen Zhongshan Hospital), Xiamen 361004 Fujian Province, China; ¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Corresponding Author: LU Quan-Yi, Professor, Senior Physician. Tel: (0592) 2292032. Email: quanyiyi@hotmail.com

Abstract Objective of this study was to establish a method for simultaneous detection of *FLT3-ITD* and *NPM1* gene mutations in AML. A double PCR was firstly designed and optimized to amplify both exon 12 of *NPM1* and exon 14-intron 14-exon 15 of *FLT3*, with the aim of detecting almost all reported mutations. After optimization, a touchdown PCR was chosen for the multiplex PCR procedure, with the primer concentrations of *NPM1* and *FLT3-ITD* being 200 nmol/L and 152 nmol/L respectively. The PCR amplicons were separated by capillary electrophoresis and the presence of mutants was recognized by the size difference between the mutants and wild-type products. The areas of mutant peak and wild-type peak were used to calculate the mutant/wild-type ratio. All the positive mutated samples were confirmed by sequencing. The results showed that 17 patients with *NPM1* mutation, 15 patients with *FLT3-ITD* mutation, 6 patients with both *NPM1* and *FLT3-ITD* mutations were found among 93 patients. 7 patients with *M₂*, 4 patients with *M₄*, 5 patients with *M₅* and 1 patient with *M₆* were found out of 17 patients with *NPM1* mutation, in which 10 patients were male and 7 patients were female. 15 patients were with type A, 1 patient was with type B and 1 patient was with type Nm, strikingly 1 CML patient in blast crisis was found to carry a type A mutation. Among 15 patients with *FLT3-ITD* mutation 1 patient with *M₁*, 8 patients with *M₂*, 2 patients with *M₃*, 1 patient with *M₄*, 3 patients with *M₅* were found, in which 5 patients were male and 10 patients were female. Sequencing results further confirmed the accuracy and reliability of this method. It is concluded that a novel method with the ability to detect both *FLT3-ITD* and *NPM1* mutations has been developed when genomic DNA was templated. This method is fast, easy, accurate and capable to calculate the mutant/wild-type ratio.

Key words leukemia; *NPM1*; *FLT3*; internal tandem duplication; capillary electrophoresis

J Exp Hematol 2011; 19(3): 717-720

通讯作者: 鹿全意, 教授, 主任医师. 电话: (0592) 2292032. Email: quanyiyi@hotmail.com

* 福建医科大学 2008 研究生

2010-11-22 收稿; 2010-12-17 接受

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种高度异质性的疾病^[1], 目前已经在 AML 里发现了多种基因突变, 其中最常见的是 NPM1 (nucleophosmin) 基因突变和 FLT3 基因 (Fms-like tyrosine kinase-3) 的内部串联重复突变 (internal tandem duplication, ITD), 二者在 AML 的发生率约为 35% 和 20%^[2-4], 根据目前临床研究的证据, 它们分别代表预后好和预后差的 AML 类型^[4-7], 而且两者经常同时出现^[4-6]。因此, 同时检测 AML 里这 2 种最常见的基因突变, 不仅可用于 AML 病人的预后分析, 也有助于确定治疗方案和预测病人对治疗的反应。我们在国外研究方法的基础上建立了一种同时筛查这 2 种突变的双重 PCR 检测体系, 通过对 92 份 AML 标本的检测进行了临床验证。

材料和方法

病例

59 例患者来自 2008 年 7 月 - 2010 年 1 月在厦门大学附属中山医院住院的初诊病例, 33 例标本来自广州市第一人民医院。除了 2 例初诊即为慢性髓系白血病急变期外 (M₂ 和 M₅ 各 1 例), 其余均为初发的 AML。在 92 份病例中男 48 例, 女 44 例, 其中 M₀ 2 例, M₁ 4 例, M₂ 31 例, M₃ 20 例, M₄ 8 例, M₅ 23 例, M₆ 1 例, M₇ 1 例。全部病例经过骨髓细胞学和染色体分析, 符合急性髓系白血病诊断标准。正常对照包括 2 名健康男性志愿者外周血和 293T 细胞系。

基因组 DNA (gDNA) 提取

取确诊未治疗的 AML 患者骨髓或外周血 (白血病细胞 > 50%) 3-5 ml 根据 TIANamp Genomic DNA Kit (天根生化科技有限公司, 北京) 说明书提取白血病细胞 DNA, 所提取的 gDNA 利用 ND-1000 紫外分光光度计 (Nanodrop 美国) 进行浓度测定, 并将终浓度调为 10 ng/μl。

二重 PCR 反应体系的建立

NPM1 和 FLT3 引物分别为 NPM1-F: 5'-C_{yt} 5'-TTAACTCTCTGGTGTAGAAATGAA-3'; NPM1-R: 5'-GGTAGGGAAAGTTCTCACTCTGC-3'; FLT3-F: 5'-C_{yt} 5'-CTAACTGACTCATCATTTTCATCTCTGA-3'; FLT3-R: 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3'。经过优化后的 PCR 体系为: 25 μl 含 5 μl 10 × PCR buffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂), 0.2 mmol/L dNTP, 1

U TaqHS DNA 聚合酶 (宝生物工程有限公司, 大连), 引物 (NPM-F 和 NPM-R 均为 200 nmol/L, FLT3-F 和 FLT3-R 均为 152 nmol/L) 和 5 μl gDNA 模板。在 T3 Thermocycler (Bimeta 德国) 上进行 PCR 扩增, 程序如下: 95℃ 预变性 3 分钟; 然后 95℃ 变性 30 秒, 61℃ 退火 30 秒 (每个循环下降 0.5℃), 72℃ 延伸 40 秒, 共 18 个循环; 95℃ 变性 30 秒, 52℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 40 秒, 共 17 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 分钟。

毛细管电泳

PCR 的扩增产物首先用去离子水稀释 50-200 倍, 得到 A。用去离子甲酰胺 (SLS 美国 Beckman Coulter 公司, p/n 608082) 将荧光标记的分子量标准 (CEQ 600 size standard mixture, Beckman Coulter, p/n 608095) 稀释 10 倍, 得到 B。取 1 μl A, 2.5 μl B 与 16.5 μl SLS 混匀后, 转移到 96 孔上样板中, 并滴加一滴石蜡油防止挥发。在 CEQ 8800 遗传分析系统 (Beckman Coulter 公司) 上采用 "Frag-2" 程序进行毛细管电泳。根据仪器自带软件进行 "Fragment Analysis", 确定是否存在 NPM1 突变或 FLT3-ITD 突变。对于突变阳性标本, 根据软件给出的野生型峰面积 S1 和突变型峰面积 S2 按照以下公式来计算突变比例:

$$\text{Mutant level\%} = (S2/S1 + S2) \times 100\%$$

测序

对于突变阳性的标本, 将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收目的片段, 连接到 pMD18-T 载体 (宝生物工程有限公司, 大连), 转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 以菌液为模板进行 PCR 扩增和琼脂糖电泳, 挑选至少 4 个阳性克隆 (对于 FLT3-ITD 标本, 选择琼脂糖凝胶电泳的条带位置相对靠后的克隆) 送 Invitrogen 公司测序验证。

结 果

稳定的双重 PCR 检测体系的建立

以 293T 细胞的 gDNA 为模板进行 PCR 体系的优化。首先, 通过琼脂糖凝胶电泳确认单重 PCR 产物的特异性, 2 对引物都能分别扩增出预计大小的亮带。之后将 2 对引物放在 1 个 PCR 体系里进行扩增, 并进行反应条件的优化处理: ①在最初的 PCR 体系里, 除了 2 条预计大小的条带外, 还有较大的非

特异扩增产物。针对于此,我们引进了 touchdown PCR 程序,在最初的 18 个循环中,退火温度从 61 度逐次降低,每经 1 个循环下降 0.5 度。之后的 17 个循环中均以 52 度进行退火。初始循环较高的退火温度保证扩增特异性,而后面的扩增较低的退火温度则保证扩增产物量。通过这种改变,非特异的扩增条带得以去除。②引物比例的优化。通过引物浓度的调节,最终确定的体系中 NPM1 引物与 FLT3 引物的浓度比例为 200 nmol/L:152 nmol/L。在这种条件下,2 种产物在毛细管电泳中的峰高基本一致(附图 A)。③多重 PCR 产物稀释倍数的优化。分别作了 10 倍、25 倍、50 倍、100 倍、150 倍、200 倍、250 倍的稀释。结果表明,50–200 倍的稀释度对应的荧光产物的峰高都比较理想。

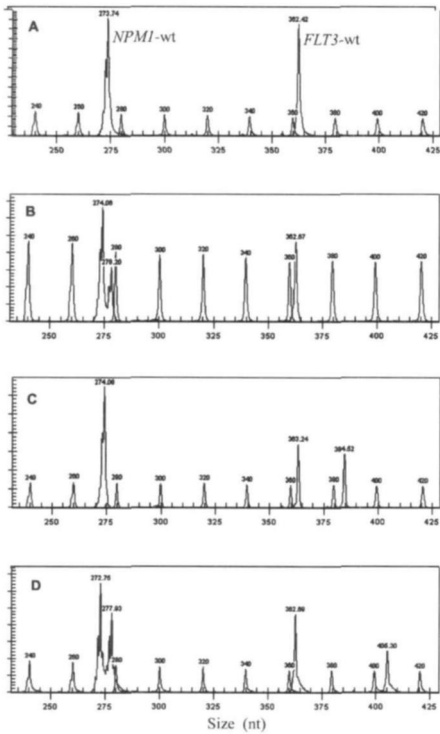


Figure. Capillary electrophoresis results of products amplified by complex PCR. A: normal control B: NPM1⁺/FLT3-ITD⁻ sample C: NPM1⁻/FLT3-ITD⁺ sample D: NPM1⁺/FLT3-ITD⁺ sample

AML 中 NPM1 和 FLT3 基因突变检测

在 92 份 AML 标本中,发现 17 例 NPM1 突变阳性标本 (18.5%) 和 15 例 FLT3-ITD 阳性标本 (16.3%),典型结果如附图所示。虽然预计大小 (NPM1 产物为 266 bp,FLT3 产物为 357 bp)与实际大小差了 6–7 nt (与毛细管阵列使用时间长有关),

但这对结果的判断没有影响。在 NPM1 突变阳性标本中,有 7 例 M₂、4 例 M₄、5 例 M₅、1 例 M₆,其中 10 例男性、7 例女性。在 FLT3-ITD 突变阳性标本中,有 1 例 M₁、8 例 M₂、2 例 M₃、1 例 M₄、3 例 M₅,其中 5 例男性、10 例女性。有 6 例为 NPM1 突变和 FLT3-ITD 突变双阳性。在 2 例 CML 急变为 AML 的标本中,有 1 例为 NPM1 阳性。

利用 CEQ 8800 分析软件给出的突变型和野生型峰面积,算出突变子所占的比例,进而推算突变细胞占总细胞的比例。我们发现,在突变双阳性的标本中,有 5 份标本 NPM1 的突变子比例都高于 FLT3-ITD 的比例,有 1 份标本的情况相反。

阳性标本测序

利用多重 PCR 检出的突变阳性标本均进行了测序验证。测序结果证明,所有检出的阳性标本均携带有对应的突变。在 17 份 NPM1 突变阳性的标本中,有 15 份为 A 型突变,1 份为 B 型突变,1 份为 Nm 型突变(附表)。在两份 CML 急变为 AML 的标本中,有 1 份为 NPM1 突变,突变类型为 A 型。在 15 份 FLT3-ITD 突变阳性的标本中,有 2 份标本同时带有 2 种 FLT3-ITD 突变,另外 13 份仅带有 1 种 FLT3-ITD 突变。这 17 种 ITD 插入的位置均落在外显子 14 上,插入片段的大小为 18–87 bp,中位值 42 bp。

Table 1. Types of NPM1 mutation detected

Type of mutation	Sequence of nucleic acid (NPM1 exon 12)	Sequence of protein	Number of cases
Wild	GATCTCTG – – – GCAGTGGAGGA AGTCTCT	DLWQWRKSL	75
A	GATCTCTGTCTGCGAGTGGAGG AAGTCTCT	DLCLAVEEVSLRK	15
B	GATCTCTGCATGGCAGTGG AGGAAGTCTCT	DLCAVEEVSLRK	1
Nm	GATCTCTGCCAGGCAGTGGAGGA AGTCTCT	DLQAVEEVSLRK	1

Note: A, B and Nm types are assigned referring to Ran et al [8].

讨 论

目前发现的 NPM1 基因突变至少有 55 种类型,且几乎所有的突变是 NPM1 基因的第 12 号外显子上的插入突变,导致突变型基因比野生型多了 4 个碱基^[8]。最常见的是 A 型、B 型和 D 型突变,约占 NPM1 突变的 75%–80%、10% 和 5%^[9]。FLT3-ITD 突变是发生在近膜结构域 (juxtanembranedomain) 中的插入突变,主要存在于 FLT3 基因的第 14 外显子上,少数发生在外显子 15 和内含子 14 上^[10–12]。插入片段的大小因病人而异,Thiede

等^[3]报道的长度为 6–180 bp 而 Schnittger 等^[2]报道的为 3–400 bp

由于琼脂糖凝胶电泳不足以区分 NPM1 基因的 4 bp 的变化, 因此需要采用更高分辨率的检测方法。Noguera 等^[13]发展了一种基于毛细管电泳的检测方法, 这种方法可以快速、准确地同时检测 FLT3-ITD 和 NPM1 突变, 分辨率可以达到 1 bp 的差异, 且具有较高的检测通量。但是, 这种方法是从 RNA 水平进行检测, 需要逆转录过程, 容易受到 RNA 质量的影响, 而且对于发生在内含子 14 上的 FLT3-ITD 突变将会漏检。针对于此, 我们做了以下改进: ①以 gDNA 为模板进行扩增。由于 gDNA 提取保存方便, 且不需逆转录即可扩增, 因此相比 RNA 操作起来更简便易行; ②引物设计。将 NPM1 基因的引物分别设计在内含子 11(NPM1-F)和外显子 12(NPM1-R)上, 将 FLT3 基因的引物分别设计在内含子 13(FLT3-F)和外显子 15(FLT3-R)上, 从而保证能够检测出所有或几乎所有的 NPM1 突变和 FLT3-ITD 突变; ③对 NPM1 和 FLT3 引物采用单色荧光标记, 而 Noguera 等^[13]对 NPM1 和 FLT3 的引物分别标记了 2 种不同的荧光。在我们的体系里 NPM1 产物为 266 bp 或 270 bp 而 FLT3 的产物为 357 bp 或者更大, 因此标记同样的荧光 (Cy5) 也不会引起 2 种产物荧光信号的重叠。这样就有利于选择更便宜、更容易标记的荧光。

92 份 AML 标本的检测和测序验证进一步证明了该体系的可靠性和准确性。虽然预计大小 (NPM1 产物为 266 bp, FLT3 产物为 357 bp) 与实际大小差了 6–7 nt (与毛细管阵列使用时间久有关), 但这对结果的判断没有影响。NPM1 基因突变的阳性检出率明显低于国外报道的数据, 推测原因可能为: ①种族差异、地域差异; ②样本量不够大; ③92 份标本中有 20 份为 M₃, 均为 PML/RARA 融合基因阳性, 而 PML/RARA 和 NPM1 基因突变同属于白血病二次打击学说的 II 类突变, 一般不会共存。事实上, 17 例 NPM1 阳性标本没有 1 例属于 M₃ 亚型, 所以 M₃ 标本较多可能是 NPM1 阳性检出率低的一个原因。此外, 该方法可通过峰面积算出突变型基因相对于野生型的比例。Thiede 等^[14]报道, 在绝大多数的 NPM1 突变和 FLT3-ITD 突变标本中, NPM1 的突变型/野生型比例高于 FLT3, 从而推测 NPM1 突变的发生可能早于 FLT3-ITD 突变, 我们的 6 份突变双阳性病例进一步证实了这一点。

总之, 利用双重 PCR 体系结合毛细管电泳技术可以准确的检测 AML 标本的 NPM1 和 FLT3 基

因突变, 具有方便、快捷、准确、可定量的优点, 可用于常规的白血病分子诊断。

参考文献

- Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008; 1–11
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood, 2002; 99(12): 4326–4335
- Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic and prognostic features. Blood, 2009; 114(14): 3024–3032
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med, 2005; 352(7): 254–266
- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. Leukemia, 2005; 19(8): 1345–1349
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood, 2005; 106(12): 3740–3746
- Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. Blood, 2007; 109(3): 874–885
- Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukemia: towards definition of a new leukemia entity. Hematol Oncol, 2009; 27(4): 171–181
- Falini B, Martelli MP, Pileri SA, et al. Molecular and alternative methods for diagnosis of acute myeloid leukemia with mutated NPM1: flexibility may help. Haematologica, 2010; 95(4): 529–534
- Tan AY, Westerman DA, Carey DA, et al. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol, 2008; 29(1): 10
- 刘红, 于红, 贾红英. 恶性血液病 FLT3 基因突变的检测及临床意义. 中国实验血液学杂志, 2007; 15(4): 709–713
- Abuduhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. Br J Haematol, 2001; 113(4): 1076–1077
- Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. Leukemia, 2005; 19(8): 1479–1482
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood, 2006; 107(10): 4011–4020